

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620111152363

UDC _____

廈門大學

硕士学位论文

秀丽隐杆线虫 14-3-3 蛋白 FTT-2 及 AMPK
蛋白 AAK-2 对热抗性调控作用的研究

The study of *C. elegans* 14-3-3 protein FTT-2 and AMPK
protein AAK-2 function in heat stress resistance

李亚丹

指导老师姓名: 王亚梅

专业名称: 细胞生物学

论文提交时间: 2014 年 月

论文答辩时间: 2014 年 月

学位授予时间: 2014 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2014 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外，该学位论文为()课题(组)的研究成果，获得()课题(组)经费或实验室的资助，在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

()1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

()2.不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人(签名)：

年 月 日

缩略词表

英文缩写	英文名称	中文名称
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
CCD camera	Charge-Coupled Device Camera	电荷耦合元件 图像传感器
cm	centimeter	厘米，长度单位
DIC	Differential Interference Contrast	微分干涉相差
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
FUDR	Floxuridine	氟脲嘧啶脱氧核苷
GFP	Green Fluorescent Protein	绿色荧光蛋白
h	hour	小时，时间单位
L	liter	升，体积单位
L4	Larva 4	第四期幼虫
LB	Luria-Bertani culture medium	溶菌肉汤培养基
mCherry	Red Fluorescent Protein	红色荧光蛋白
Min	minute	分，时间单位
mL	milliliter	毫升，体积单位
mm	millimeter	毫米，长度单位
NGM	Nematode Growth Medium	线虫生长培养基
RNA	RiboNucleic Acid	核糖核酸
RNAi	RNA interference	RNA 干扰
RT-qPCR	Real-time PCR	实时定量 PCR
S	second	秒，时间单位
HS	Heat Shock	35℃ 热激

目录

中文摘要	I
英文摘要	II
前言	1
1 利用秀丽隐杆线虫研究与热抗性调节相关的保守基因的功能	1
1.1 秀丽隐杆线虫生物学特性	1
1.2 秀丽隐杆线虫作为模式生物的优势	2
1.3 秀丽隐杆线虫抗性调控信号通路的研究进展	3
2 14-3-3 蛋白	5
2.1 14-3-3 蛋白家族的特征	5
2.2 秀丽隐杆线虫 14-3-3 蛋白的研究现状	5
3 AMPK 蛋白	7
3.1 AMPK 蛋白的研究进展	7
3.2 秀丽隐杆线虫中的 AMPK 蛋白	10
4 本文研究的目的及意义	12
第一章 秀丽隐杆线虫 14-3-3 蛋白 FTT-2 在咽部肌肉表达对热抗性	
调控作用的研究	13
1 材料与方法	13
1.1 材料	13
1.2 方法	15
2 结果与分析	20
2.1 咽部肌肉表达 14-3-3 蛋白 FTT-2 的转基因线虫热抗性显著增强	20
2.2 咽部肌肉表达 FTT-2 引起热抗性的增强不依赖于 <i>daf-16</i> 及 <i>sir2.1</i>	21
2.3 咽部肌肉表达 FTT-2 可以诱导热激蛋白更强的表达	24
3 讨论	28
第二章 秀丽隐杆线虫 AMPK 蛋白对热抗性调控作用的研究	30
1 材料与方法	30
1.1 材料	30
1.2 方法	31
2 结果与分析	41
2.1 秀丽隐杆线虫 <i>aak-2</i> 突变体热抗性显著下降	41
2.2 <i>aak-2</i> 突变体热抗性下降可能的作用机制	42
2.3 <i>aak-2</i> 基因不同亚型对 <i>aak-2</i> 突变体热敏感性的拯救	46
2.4 AAK-2 不同蛋白结构域及关键位点对热抗性调控作用的影响	50
3 讨论	56
结论和展望	59

参考文献.....	61
附录.....	65
致谢.....	68

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Content

Abstract In Chinese	I
Abstract In English	II
Introduction	1
1.The study of conserved gene function in stress response regulation in <i>C. elegans</i>	1
1.1 Biological property of <i>C. elegans</i>	1
1.2 <i>C. elegans</i> is a good model organism	2
1.3 The stress regulation signaling pathways in <i>C. elegans</i>	3
2. The studies of the 14-3-3 proteins	5
2.1 The characteristic of the 14-3-3 protein family.....	5
2.2 14-3-3 proteins in <i>C. elegans</i>	5
3. The AMPK proteins	7
3.1 The studies of of AMPK proteins.....	7
3.2 The AMPK proteins in <i>C. elegans</i>	10
4. Aims and significance of this dissertation	12
Chapter 1 Research on <i>C. elegans</i> heat stress response by expressing	
14-3-3 protein FTT-2 in pharynx muscles	13
1.Materials and methods	13
1.1 Materials	13
1.2 method.....	15
2.Results and analyses	20
2.1 Transgenic lines expressing FTT-2 in pharyngeal muscle cells have increased thermotolerance.....	20
2.2 The increased thermotolerance by expressing FTT-2 in pharyngeal muscle cells does not require <i>daf-16</i> or <i>sir2.1</i>	21
2.3 Transgenic lines expressing FTT-2 in pharyngeal muscle cells can significantly induce Heat Shock Protein gene expression.....	24
3.Discussion	28
Chapter 2 Research on the mechanisms of stress response regulation	
by <i>C. elegans</i> AMPK protein AAK-2	30
1.Materials and methods	30
1.1 Materials	30
1.2 method.....	31
2.Results and analyses	41

2.1 <i>aak-2</i> mutants have reduced resistance to heat stress.....	41
2.2 The possible mechanisms of reduced resistance to heat stress of <i>aak-2</i> mutants.....	42
2.3 The rescuing effect of the hypersensitivity of <i>aak-2</i> mutants by different <i>aak-2</i> isoforms rescued the hypersensitive of <i>aak-2</i> mutation.....	46
2.4 Effect of AAK-2 different protein domains and key sites for regulation of heat stress response.....	50
3.Discussion.....	56
Conclusion and outlook	59
References	61
Appendixes	65
Acknowledgements	68

摘要

氧化压力、缺氧及高温等不利环境条件，通常会引发生物体的压力应激反应，来应对其对机体的毒性损害以维持机体的代谢平衡。本文利用秀丽隐杆线虫为模式生物来研究 14-3-3、AMPK 两个保守的蛋白家族对热抗性的调节功能。前期研究结果显示，秀丽隐杆线虫中编码 14-3-3 蛋白的基因 *ftt-2* 在多个组织广泛表达，但仅在咽部肌肉表达 *ftt-2* 能显著延长个体寿命并增强热抗性。本文首先通过遗传学方法分析了咽部肌肉表达 *ftt-2* 热抗性增强对抗性调节因子 *daf-16* 和 *sir2.1* 的依赖性，结果显示咽部肌肉表达 *ftt-2* 热抗性增强有其他的机制。本文进一步通过 RT-qPCR 检测了咽部肌肉表达 *ftt-2* 转基因线虫中几个热激蛋白(HSPs) 基因表达水平，结果显示在热激处理后，咽部肌肉表达 *ftt-2* 转基因线虫热激蛋白表达水平较野生型增加的更显著，暗示了其热抗性的增加可能与热激蛋白表达水平的升高相关。为了研究 AAK-2 在热应激反应中的调控功能，我们构建了 AAK-2 不同基因亚型及缺失 AAK-2 不同蛋白结构域的转基因线虫，并分析它们对热敏感的 *aak-2* 突变体的拯救情况。实验结果显示，AAK-2 蛋白 N 端保守的激酶区及该区域上的第 181 位苏氨酸(Thr)在热应激反应中起着关键作用。鉴于 14-3-3 和 AMPK 蛋白的高度保守性，以及已有研究表明应激调控机制在进化上也具有一定保守性，本文的研究结果将有助于加深人们对于 14-3-3 及 AMPK 蛋白家族对应激调控的作用机制的了解与认识。

关键词：14-3-3 蛋白；AMPK 蛋白；热抗性

Abstract

Environmental stress such as oxidative stress, hypoxia, and heat shock often causes proteotoxic damage, which triggers the stress-response machinery in order to maintain cellular homeostasis. In this paper, we use *C. elegans* as a model to study the regulatory mechanism of two conserved proteins 14-3-3 and AAK-2 on heat-resistance. Previous results showed that *ftt-2* is widely expressed in many tissues, and *ftt-2* overexpression in pharyngeal muscles can significantly extend life span and increase thermotolerance. This paper firstly analyzed whether the increased thermotolerance by expressing FTT-2 in pharyngeal muscles was dependent on the stress regulatory factors *daf-16* and *sir2.1*. Our results showed it was dependent on other mechanisms. We next measured the gene expression level of several heat shock protein (HSPs) genes in transgenic strain expressing *ftt-2::gfp* in pharyngeal muscles by RT-qPCR. Expressing FTT-2 in pharyngeal muscle cells can induce higher gene expression of heat shock proteins (HSPs) in response to heat shock treatment, suggesting the increased thermotolerance may be associated with elevated levels of HSPs. In order to further determine *aak-2* functions on heat shock response regulation, we constructed transgenic lines expressing different *aak-2* isoforms and distinct structural domains to analyze their rescuing effect on heat-sensitive *aak-2* mutants. Our results suggested the conserved N-terminal kinase domain and threonine 181 of AAK-2 protein may be important for the heat-resistance regulation. Give the high conservation of 14-3-3 and AMPK proteins and the fact that stress regulation mechanism may be also highly conserved, our present study will be helpful to further understand regulatory mechanism of two conserved proteins 14-3-3 and AMPK proteins on stress response.

Keywords: 14-3-3 protein; AMPK protein; thermotolerance

前言

1 利用秀丽隐杆线虫研究与热抗性调节相关的保守基因的功能

1.1 秀丽隐杆线虫生物学特性

秀丽隐杆线虫属于线形动物门，线虫纲动物，学名为 *Caenorhabditis elegans*，简称 *C. elegans*^[1]。秀丽隐杆线虫的成虫只有 1 mm 左右^[2]，主要以微生物为食，易于被人工养殖，且不会对人类和其它动植物造成危害。秀丽隐杆线虫是一种非常理想的模式生物，目前已应用到从胚胎发育学到老年学等各个生物学研究领域。

自然界存在的秀丽隐杆线虫有雌雄同体和雄虫两种，雌雄同体虫体尾端较细长，而雄虫尾端则较粗，比较钝圆^[1]。通常用于实验室研究的是雌雄同体线虫，雌雄同体线虫可以进行自我繁殖，正常培养条件下，一只雌雄同体成虫可以产 300 个左右的后代且基本为与母本基因型相同的雌雄同体，其也能产生雄虫，但概率仅为 1%。雄虫可以通过对培养条件施加外界刺激，例如热激，紫外等，而使后代发生突变获得。雌雄同体与雄虫交配的后代，理论上 50%是雌雄同体，50%是雄性，所以可以采用遗传杂交的方法获得特定基因型的线虫用于研究。

在实验室 20°C 的培养条件下，秀丽隐杆线虫从卵发育到成虫只需要三四天，野生型成虫的平均寿命约为 15 天左右。受精卵孵化的过程称为胚胎发育期，经过这个时期受精卵便会发育为 L1 期的线虫，L1 期线虫仅约 250μm 长，但身体结构与成虫相似。在食物充足的条件下，细胞可以持续分裂，依次经历幼虫期的四个阶段（L1、L2、L3、L4）后蜕变为成虫，如果在 L2 幼虫期的末期，遇到生长环境拥挤，食物缺乏等不利于生长的条件，则会在第二次蜕皮后进入 dauer 期而不是进入 L3 期（图 1）。dauer 期的线虫比 L3 的幼虫体型更瘦长，体表覆盖一层较厚的角质层，且基本不吃不动，可以存活几个月，当环境恢复正常后，dauer 期的线虫可以蜕皮直接进入 L4 期^[3]，经过幼虫四期之后，线虫便进入成虫期。在发育过程中，秀丽隐杆线虫共生成 1090 个细胞，其中 131 个将会死亡，所以野生型秀丽隐杆线虫成虫有 959 个细胞，并且每个细胞的位置固定不变^[4]，这个



一般模式生物都具有以下特点：其生理特征可以代表生物界某一大类群；容易获得并易于在实验室内饲养、繁殖；世代短、子代多、遗传背景清楚；易于进行实验操作。本论文所采用的模式生物秀丽隐杆线虫，不仅拥有一般模式生物的特点，还具有它独特的优势：

秀丽隐杆线虫的储存也非常方便，不需要专门的设备，在液氮或者-80℃冰箱即可进行冷冻保存，Sulston 等发现将线虫置于 30%甘油中并保存在液氮条件下，线虫的保存时间可长达 25 年，这使得具有特殊遗传背景的虫株可以长期保留，这一优势是其他模式动物所不具备的。

秀丽隐杆线虫通体透明，可以直接在普通光学显微镜下进行观察，便于研究人员通过显微镜观察活体线虫的内部结构，而且使用荧光显微镜便可直接观察活体虫体内被荧光蛋白标记的特定基因的表达情况。

秀丽隐杆线虫遗传背景清楚，秀丽隐杆线虫是第一个完成基因组测序的动物，它的基因组的大小为 9.7×10^7 碱基，大约是人类基因组的 1/30，编码序列占整个基因组的 27%，基因组序列 40% 与人类同源^[5]。通过比较基因组学方法推测出线虫的大约 83% 蛋白序列存在人类的同源基因，因此对秀丽隐杆线虫的研究结果可能可以运用到人类的疾病研究领域。

1998 年 Fire 等在秀丽隐杆线虫中发现了 RNA 干扰现象^[6]，RNA 干扰(RNA interference) 是指一种由双链 RNA 诱发的基因沉默现象，其作用机制是通过阻断特定基因的翻译或转录来抑制基因表达。当细胞中导入与内源性 mRNA 编码区同源的双链 RNA 时，该 mRNA 会发生降解而致使基因表达沉默^[7]。RNA 干扰相较其他基因沉默的便利之处在于在植物和线虫中，RNAi 具有传递性，可在细胞之间传播，目前 RNA 干扰技术已被广泛用于基因功能的研究中。

综上所述，经过短短四十年发展，以秀丽隐杆线虫为研究对象的重大科学发现层出不穷，线虫已成为现代生命科学领域研究的重要的模式生物之一。

1.3 秀丽隐杆线抗性调控信号通路的研究进展

近年来，秀丽隐杆线虫越来越多的应用于生物对环境抗性机制的研究中，通常可以通过人为改变外界条件筛选相关基因，或者采用 RNAi 及基因敲除技术使相关基因突变来观察表型改变的方法，来确定基因间的相互关系及基因参与的信号途径及其功能^[8]。秀丽隐杆线虫具有先天免疫防御系统^[9,10]，涉及一系列产生抗性的信号通路，例如 MAPK（促分裂原活化蛋白激酶）、insulin/IGF-1（胰岛素/胰岛素生长因子 1）即 DAF-2 信号通路和 TGE- β （转化生长因子- β ）等在对抗外界不良环境的影响方面发挥着重要作用。

（1）DAF-2 信号通路

目前对秀丽隐杆线虫的 DAF-2 应激途径研究得比较透彻，该途径在氧化应激和生长发育方面都发挥重要作用。DAF-16 是 FOXO 蛋白家族在秀丽隐杆线虫中的同源基因，也是胰岛素/胰岛素样生长因子信号通路中的关键调控分子，在

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库